ALOKA
Labelling ONE

初版：20101203
RN1-3762Rev.0

RNA 合成用試薬 グルタミン-UTP、NTP セット 取扱説明書

ALR-102　　保存温度 −20℃

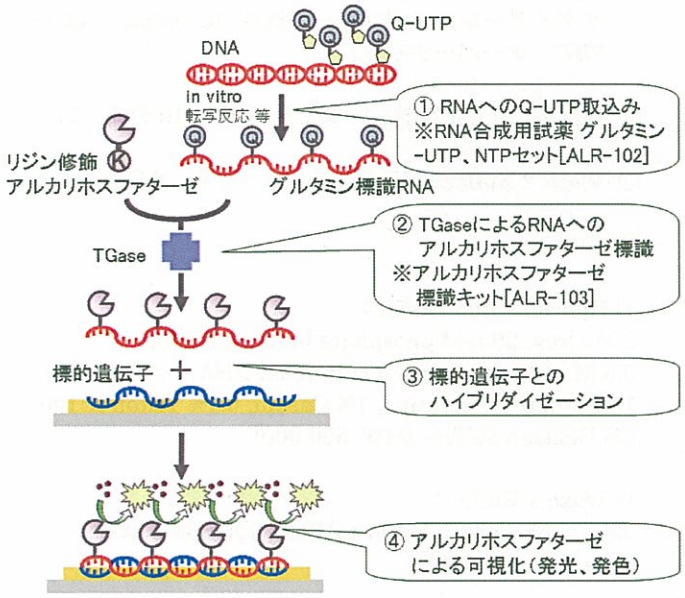
注意

1. 本製品には毒性のある物質は含まれておりませんが、万が一、試薬が皮膚や目に付着、あるいは口内に入った場合は流水で洗い流してください。
2. 取扱説明書の使用上の注意に従ってご使用ください。

【概要】

本製品は、グルタミン残基（Q）が標識された RNA を合成するためのリボヌクレオチドセットです。

本製品添付の Q-UTP は塩基にグルタミン残基が修飾された UTP（分子量 857）であり、一般的な RNA polymerase を用いて RNA へ取込むことができます。Q-UTP が取込まれた RNA はアルカリホスファターゼ標識キット[ALR-103]によってアルカリホスファターゼを標識することができ、ノーザンブロッティングなどの検出用プローブとして使用することが出来ます。



【内容】

本製品は、5 本の試薬からなります。

試薬名	濃度	容量
ATP	20 mM	20 µL
CTP	20 mM	20 µL
GTP	20 mM	20 µL
UTP	10 mM	40 µL
Q-UTP	10 mM	16 µL

注 1) 本製品には RNA polymerase 及び反応バッファーは含まれておりません。

注 2) UTP、Q-UTP の濃度が 10 mM となっております。

【包装】

20 反応用

（取扱説明書記載の反応を実施した場合）

【保存方法】

−20℃にて保存してください。

【使用期限】

製品到着日より 6 ヶ月

（但し、未開封かつ−20℃にて保存の場合）

開封後はなるべくお早めにご使用ください。

【使用上の注意】

① 本製品をご使用の際には、取扱説明書をご一読の上、使用してください。
② 本製品は、研究用試薬です。臨床診断用には使用しないでください。
③ 本製品には毒性のある物質は含まれておりませんが、万が一、試薬が皮膚や目に付着、あるいは口内に入った場合は流水で洗い流してください。
④ 使用期限が切れた製品を使用しないでください。使用期限が切れた製品を使用した場合には反応が正確に行えない可能性があります。
⑤ 反応液の調製は氷上で行ってください。氷上で行わない場合には反応が正確に行えない可能性があります。
⑥ 転写反応産物の精製は精製カラムの使用を推奨します。Q-UTP の疎水性が高いため、一般的なエタノール沈殿による精製法では未反応の Q-UTP が沈殿し、取除けない場合があります。

【反応に必要な試薬、機器】

試薬、機器	
RNA polymerase	以下製品を推奨しております。 ・T7 RNA polymerase (881767/Roche) ・T3 RNA polymerase (1031163/Roche) ・SP6 RNA polymerase (810274/Roche)
10 x Buffer	RNA polymerase 添付の Buffer
RNase inhibitor	RNaseOUT (10777-019/invitrogen)
Water (PCR グレード)	（反応液調製用）
精製カラム	（転写産物精製用） 以下製品を推奨しております。 ・クイックスピンカラム G-50 (RNA) (1274015/Roche) ・mini Quick Spin RNA Columns セファデックス G-50 (1814427/Roche)
恒温槽	（転写反応用）
分光光度計	（転写産物濃度確認用）
アガロースゲル 電気泳動装置	（転写産物濃度確認用）

【使用方法】

(1) in vitro 転写反応

① 氷上でPCRチューブに下表の試薬を加えてください。
② 反応液を十分混合し、スピンダウンしてください。
③ PCR チューブを恒温槽にセットしてください。
④ 37℃で 2 時間インキュベーションしてください。

組成	容量	終濃度
10 x Buffer	2 μL	1 x
テンプレート DNA	200 ng	10 ng/μL
RNase inhibitor (40 U/μL)	1 μL	2 U/μL
ATP (20 mM)	1 μL	1 mM
CTP (20 mM)	1 μL	1 mM
GTP (20 mM)	1 μL	1 mM
UTP (10 mM)	1.2 μL	0.6 mM
Q-UTP (10 mM)	0.8 μL	0.4 mM
RNA polymerase	2 μL	40 U/反応
Water	to 20 μL	

メモ：UTP と Q-UTP の割合は標識率と収量から
UTP: Q-UTP = 60:40 を推奨しております。

(2) 転写産物の精製

① 使用する精製カラムのマニュアルに従って転写反応産物を精製ください。

メモ：Q-UTP の疎水性が高いため、一般的なエタノール沈殿による精製法では未反応の Q-UTP が沈殿し、取除けない場合があります。

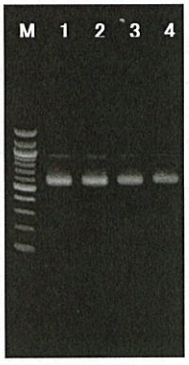
(3) 転写産物の濃度確認

① 精製後の転写産物の濃度をアガロースゲル電気泳動または吸光度測定等によりご確認ください。

メモ：アルカリホスファターゼ標識キット[ALR-103] によるアルカリホスファターゼ標識に 400 ng の転写産物を使用します。

【Q-UTP 取り込み確認】

in vitro 転写反応による Q-UTP の取り込みをアガロースゲル電気泳動で確認できます。以下は、RNA ポリメラーゼプロモーター配列を末端に持つ PCR 産物を鋳型として、UTP と Q-UTP の比率を変えて、1 kbp の領域を in vitro 転写した産物をアガロースゲル電気泳動（未変性ゲル電気泳動）した例です。



M: 分子量マーカー 100 bp
1:UTP:Q-UTP = 90 : 10
2:UTP:Q-UTP = 80 : 20
3:UTP:Q-UTP = 60 : 40
4:UTP:Q-UTP = 40 : 60

1-4: T7 RNA polymerase

【使用例】

～ドットブロットハイブリダイゼーション（RNA）～

◎in vitro 転写反応

① in vitro 転写反応液の調製（左記）に従って反応
↓
② 転写産物をクイックスピンカラム G-50(RNA)（Roche）を用いて精製
↓
③ アガロースゲル電気泳動による濃度確認

◎アルカリホスファターゼ標識反応

④ アルカリホスファターゼ標識反応（40℃、2 時間、反応組成はアルカリホスファターゼ標識キット[ALR-103] 取扱説明書に従う）
↓
⑤ Stop solution を 4 μL 加え、TGase の反応を停止

◎ハイブリダイゼーション

⑥ Hybridization Buffer [1]でプレハイブリダイゼーション（42 ～ 70℃、30 分間）
↓
⑦ Hybridization Buffer [1] にプローブを加えてハイブリダイゼーション（プローブ濃度 10 ng/mL、42 ～ 70℃、オーバーナイト）
↓
⑧ Wash 1 Buffer [2]で洗浄（42 ～ 70℃、10 分間、2 回）
↓
⑨ Wash 2 Buffer [3]で洗浄（室温、5 分間、2 回）
↓
⑩ 検出

1) Hybridization Buffer：
2 M Urea, 20 mM phosphate buffer (pH8.0),
0.5 M NaCl, 1 mg/mL torula yeast RNA,
1× Denhardt's solution, 1% Casein, 0.1% Triton X-100,
5% Dextran sulfate (MW: 500,000)

2) Wash 1 Buffer：
50 mM phosphate buffer (pH8.0), 150 mM NaCl,
0.1% Triton X-100

3) Wash 2 Buffer：
100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH9.5),
50 mM $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100

【廃棄方法】

本製品には、ポリスチレン（ケース）、ポリプロピレン（試薬チューブ）、紙（取扱説明書）を用いています。廃棄の際は分別し、都道府県・市町村が定める廃棄物の処理法に従って廃棄してください。

製造販売元
アロカ株式会社
〒181-8622 東京都三鷹市牟礼 6 丁目 22 番 1 号
計測システム営業部 (0422)45-5131
http://www.aloka.co.jp
e-mail: bio@aloka.co.jp